

EFECTUL STATINELOR ASUPRA OXIDULUI NITRIC ÎN PERIOADA PRECOCE ŞI TARDIVĂ DUPĂ ANGIOPLASTIA CORONARIANĂ

Carolina Dumanschi, doctorand Institutul de Cardiologie

Liliana Simionov, doctorand Institutul de Cardiologie

e-mail : carolina_dumanschi @yahoo.com, tel.060900009

Rezumat

În ultimul deceniu, conceptul de efect pleiotropic al statinelor a fost consolidat de un număr mare de studii pe culturi de celule, animale, precum studii de translație. Statinele s-au dovedit a suprima activitatea enzimelor pro-oxidante și pro-inflamatorii în endoteliu. Aceasta duce la creșterea biodisponibilității oxidului nitric și îmbunătățirea funcției endoteliale. Disfuncția endotelială și dezechilibrul dintre oxid nitric (NO) și speciile reactive de oxigen produse în endoteliul vascular sunt primii pași în aterogeneză. Prin urmare, este important să se înțeleagă mecanismele prin care statinele pot modifica funcția endotelială. Scopul studiului de față a fost determinarea nivelului markerului disfuncției endoteliale (oxidului nitric) la etapele precoce și tardive după implantarea stentului coronarian și administrarea simvastatinei. A fost o creștere semnificativă a oxidului nitric la 6 luni după angioplastia coronariană și, anume: în lotul 1 – 87,26 $\mu\text{M/L}$, lotul 2 – 72,37 $\mu\text{M/L}$, lotul 3 – 95, 33 $\mu\text{M/L}$ – toate trei nivele fiind mai mari decât nivelele inițiale.

Cuvinte-cheie: statine, angioplastia coronariană, oxidul nitric.

Summary. Effect of statins on nitric oxide in early and late period following coronary angioplasty

In the last decade, the concept of statin pleiotropy has been reinforced by a large number of cell culture, animal, and translational studies. Statins have been shown to suppress the activity of pro-oxidant and pro-inflammatory in the endothelium. This leads to increased NO bioavailability and improved endothelial function. Endothelial dysfunction and the imbalance between nitric oxide (NO) and reactive oxygen species production in the vascular endothelium are important early steps in atherogenesis. It is therefore important to understand the mechanisms by which statins can modify endothelial function and affect atherogenesis. The aim of the present study was to determine endothelial dysfunction marker levels (nitric oxide) at early and late stages after coronary stent implantation and administration of simvastatin. There

was a significant increase in nitric oxide 6 months after coronary angioplasty: in group 1 to 87.26 $\mu\text{M} / \text{L}$, group 2 - 72.37 $\mu\text{M} / \text{L}$, group 3 - 95, 33 $\mu\text{M} / \text{L}$ - all three levels are higher than initial levels.

Key words : statins, coronary angioplasty, nitric oxide

Резюме. Эффект статинов на окись азота в ранние или поздние периоды после коронарной ангиопластики

В последнее десятилетие концепция плейотропных эффектов статинов была подкреплена большим числом исследований на клеточных культурах, животных и трансляционных исследований. Статины показали подавления активности про-окислительных и провоспалительных ферментов в эндотелии. Это приводит к увеличению биодоступности оксида азота и улучшением эндотелиальной функции. Дисфункция эндотелия и дисбаланс оксида азота (NO) и активных форм кислорода, произведенного в эндотелий сосудов является первым шагом в атерогенезе. Поэтому важно, чтобы понять механизмы с помощью которых статины могут изменять функцию эндотелия. Целью настоящего исследования было определить эндотелиальные уровни дисфункция маркеров (окись азота) на ранних и поздних стадиях после коронарного имплантации стента и введения симvastатина. Было значительное увеличение оксида азота через 6 месяцев после коронарной ангиопластики, а именно: в 1 группе до 87,26 мкМ / л, во 2 группе - 72,37 мкМ / л, в 3 группе - 95, 33 мкМ / л - все три уровня выше, чем исходные уровни.

Ключевые слова: статины, коронарная ангиопластика, оксид азота

Actualitatea temei

La moment medicina cardiovasculară este focusată pe prevenția primară și secundară a patologiei cardiovasculare (CVS) și agenții hipolipidemianți, așa că statinele, sunt de prima linie în acest caz. Pe parcursul ultimului deceniu multiple trialuri clinice randomizate au confirmat rolul în reducerea riscului atât în prevenția primară, cât și cea secundară: reduce evenimentele nonfatale la pacienții cu risc CVS [1]; scade incidența infarctului miocardic postprocedural [2]; îmbunătățesc rezultatele după accident cerebrovascular [3]; reduce chiar incidența evenimentelor cardiace majore [4].

Este unanim recunoscut faptul că disfuncția endotelială în peretele arterial uman este un pas important în aterogeneză la început și se caracterizează prin scăderea producției de oxid nitric (NO), fiind cel mai puternic vasodilatator. Expunerea endoteliului la speciile reactive de oxigen (SRO) joacă un rol important în fiziopatologia disfuncției endoteliale. Dereglarea homeostazei vasculare reduce biodisponibilitatea NO și declanșează o cascadă de evenimente care duce în final la formarea plăcii aterosclerotice [5]. Prin urmare, intervențiile care vizează îmbunătățirea echilibrului dintre SRO și biodisponibilitatea NO în endoteliul vascular poate fi benefică atât în prevenția primară, cât și cea secundară.

Disfuncția endotelială este în general considerată ca fiind unul dintre evenimentele cheie care anticipează procesul aterosclerotic.

Disfuncția endotelială se caracterizează prin disponibilitate redusă a NO; aceasta este o moleculă gazoasă care difuzează la mușchiul neted vascular. NO are un rol major în reglarea tonusului vascular, opunându-se acțiunilor vasoconstrictorii a factorilor precum endotelina-1. Mai mult decât atât, NO este, de asemenea, implicat în reglarea și altor procese,

cum ar fi agregarea trombocitelor și adeziunea leucocitelor, jucând astfel un rol integral în homeostaza vasculară [6].

Sursa enzimatică majoră de NO în rețeaua vasculară este oxid nitric sintetaza (eNOS), care se află predominant în celulele endoteliale. eNOS este un complex homodimer care utilizează L-arginină și oxigen molecular (O_2) ca substrat pentru a produce NO și l-citrulină.

Măsurarea funcției endoteliale a fost stabilită ca un predictor important al viitoarelor evenimente cardiovasculare, independent de alți factori de risc. Factorii de risc aterosclerotici clasici, cum ar fi diabetul zaharat, hipertensiunea arterială și fumatul, toate au fost legate de producția ridicată de SRO în peretele vascular. Un eveniment major în ateroscleroză este oxidarea moleculelor de lipoproteine, în primul rând a LDL de către SRO, ceea ce duce la formarea de LDL oxidat (oxLDL). Acesta are loc principal în spațiu subendotelial, mai degrabă decât în plasmă, care găzduiește o varietate de antioxidanți cu mecanismele de apărare [7].

Decuplarea eNOS mediată de SRO provoacă disfuncție a stratului endotelial. Legarea oxLDL la receptorul-lectina induce în cele din urmă la eliberarea de citokine inflamatorii (cum ar fi interleukina [IL]-6) și crește exprimarea moleculelor de adeziune celulară (cum ar fi molecula de adeziune celulară vasculară 1 [VCAM-1]). Ca urmare, monocitele circulante sunt atrase vascular de endoteliu și, aderă datorită exprimării crescute a moleculelor de adeziune și se infiltrează subendotelial. Acolo, ei fagocitează moleculele de oxLDL, dobândind caracteristici asemenea macrofagelor și, în cele din urmă se transformă în celule spumoase. Aceasta agravează și mai mult procesul inflamator în peretele vascular și creează un cerc vicios în cazul în care mai multe monocite / ma-

crofage sunt atraşi de spaţiul subendotelial. Acumularea de celule spumoase încărcate cu lipide şi paralel migrarea / proliferarea de celule musculare netede în cele din urmă duc la formarea plăcii aterosclerotice. Studiile analizate pe modele experimentale şi, clinice au dat rezultate care sunt în mare măsură în concordanţă cu studiile de bază. Prin urmare, stresul oxidativ este acum larg acceptat ca o cheie componentă a bolii CVS umane [8].

Data fiind implicarea SRO în patogeneza aterosclerozei, o abordare terapeutică logică părea la prima vedere fie administrarea de suplimente antioxidante alimentare, cum ar fi acidul ascorbic (vitamina C), tocoferol (vitamina E) şi altele. Aceşti compuşi acţionează ca captatori exogeni SRO şi suplimentarea lor a fost considerată a fi una raţională. Într-adevăr, din 1994, mai mult de 50 de studii clinice randomizate care au folosit vitamine antioxidante au fost publicate, cu rezultate dezamăgitoare. Cea mai recentă meta-analiză, pe baza unei populaţii totale de aproape 300.000 de participanţi repartizaţi pe 50 de studii clinice randomizate, au ajuns la concluzia că nu există nici o dovadă în favoarea suplimentării antioxidante pentru prevenirea patologiei CVS [9].

Statinele, prin acţiunile lor de scădere a LDL şi prin efectele lor pleiotropice asupra SRO, ar putea constitui o strategie elegantă şi eficientă care vizează restabilirea echilibrului redox în comparaţie cu suplimentele antioxidante tradiţionale.

Statinele sunt molecule organice derivate iniţial din ciuperci. Ele îşi exercită efectele prin inhibarea enzimei 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductazei [10]. Deoarece un procent semnificativ a colesterolului total în corpul uman este produs endogen, inhibarea HMG-CoA de statine conduce la o ulterioară reducere a colesterolului şi, în special, biosinteza de lipoproteine cu densitate joasă (LDL) [11].

Disfuncţia endotelială este considerată ca unul dintre evenimentele cheie la începutul procesului de ateroscleroză. Disfuncţia endotelială se caracterizează prin reducerea disponibilităţii oxidului nitric (NO).

Un prejudiciu adus endoteliului contribuie la iniţierea procesului de aterogeneză. Disfuncţia endotelială, o manifestare timpurie a unui astfel de prejudiciu, este asociată cu o vasoconstricţie paradoxală la acetilcolină, cauzată de insuficienţa în eliberarea şi activitatea oxidului nitric (NO). Răspunsurile anormale vasomotorii dependente de endoteliu duc la progresia pe termen lung a aterosclerozei şi a evenimentelor coronariene asociate, la scurt timp după chirurgicală vasculară. Prin urmare, nu este surprinzător faptul că abilitatea statinelor pentru a îmbunătăţi disfuncţia endotelială, un efect de clasă, a primit multă atenţie în ultimii ani [12].

Scopul studiului

Evaluarea eficacităţii statinelor asupra oxidului nitric în perioada precoce şi tardivă în urma procedurilor intervenţionale coronariene cu implant de stent.

Criterii de includere: pacienţii cu angină pectorală stabilă, care au urmat procedura de angioplastie coronariană.

Criterii de excludere:

- stenturi multiple, diferite,
- administrarea concomitentă a altor preparate cu efect de eliberare NO (carvedilol, nebivolol),
- flux coronarian încet după PCI,
- creatininemia >130 $\mu\text{mol/l}$,
- maladii hepatice active,
- insuficienţa cardiacă avansată,
- reacţii adverse la statine.

Material şi metode

În studiu au fost incluşi 120 pacienţi selectaţi pe parcursul anului 2011-2014 în Institutul de Cardiologie. Pacienţii au fost divizaţi în 3 loturi, în dependenţă de doza simvastatinei administrate: 1 lot au primit 20 mg de simvastatină, lotul 2 – 40 mg de simvastatină, lotul 3 – 80 mg de simvastatină. A fost studiată eficacitatea tratamentului cu simvastatină asupra disfuncţiei endoteliale, prin măsurarea nivelului oxidului nitric la diferite etape: pre angioplastie coronariană (PCI), post PCI, 1 lună, 3 luni, 6 luni şi 12 luni după procedură. Datele au fost introduse conform chestionarului elaborat.

Dozarea oxidului nitric (NO) s-a efectuat conform procedurii descrise de Метельская В. А., Гуманова Н. Г. în modifi caţia lui V. Gudumac ş.a.

Principiul metodei se rezumă la deproteinizarea materialului biologic, reducerea nitraţilor în nitriţi, prelucrarea supernatantului obţinut cu reactivul Griess şi măsurarea densităţii optice a produsului reacţiei cu determinarea ulterioară a concentraţiei nitritului pe baza curbei de calibrare.

Mediul de reacţie conţine 0,05 ml supernatant obţinut la prelucrarea a 0,10 ml material biologic (ser sanguin) cu 0,01 ml sol. 20% ZnSO_4 , 0,05 ml sol. 0,8% VCl_3 şi 0,05 ml reagent Griess (sol. 2% sulfanilamidă şi sol. 0,1% naftilendiamină în 2,5% acid ortofosforic se amestecă în raport 1:1). Se incubează 10 min la temperatura camerei. Absorbanţa probei de cercetat se măsoară la 540 nm faţă de proba blank, care se montează în mod analogic ca şi proba de cercetat, dar materialul biologic se substituie cu 0,05 ml H_2O distilată. Calculul s-a efectuat conform curbei de etalonare, construită în baza diluţiilor succesive ale soluţiei standard stock de nitrit de sodiu.

Rezultate şi discuţii

În structura pacienţilor examinaţi au predominat bărbaţi cu vârsta cuprinsă de la 39 la 74 ani, vârsta

medie fiind $59,33 \pm 0,63$ ani (tab. 1). S-au identificat prezența factorilor de risc, printre care diabetul zaharat (20%), fumatul (4,5%), anamneza eredocolaterală agravată (47,5%), patologie cardiacă prematură ($B < 55$ ani, $F < 65$ ani) - 32,5%.

Tabelul 1

Caracteristica generală a lotului de studiu

Indice	Valoare
Vârsta medie, ani ($M \pm m$)	$59 \pm 0,63$
Bărbați, % (nr.)	80 (96)
Femei, % (nr.)	20 (24)
DZ	20 (24)
Alterarea toleranței la glucoză % (nr.)	10,0 (12)
Glicemia „a jeun” modificată	13,4 (14)
Fumători curenți, % (nr.)	4,2 (5)
Anamneza eredocolaterală agravată % (nr.)	47,5 (57)
Patologie cardiacă prematură ($B < 55$ ani, $F < 65$ ani) % (nr.)	32,5 (39)
Alte probleme cardiace % (nr.)	6,7 (8)

La pacienții înrolați în studiu s-au înregistrat patologii concomitente și anume: patologia pulmonară 16,7%; patologia glandei tiroide 4,2%; patologia ficatului 5,8%; patologia gastrointestinală 10,8%; patologia sistemului urinar 15%; accident cerebrovascular în anamneză 1,7% (tabelul 2).

Tabelul 2

Patologii concomitente înregistrate la lotul general de studiu

Patologia pulmonară % (nr.)	16,7 (20)
Patologia gl. tiroide % (nr.)	4,2 (5)
Patologia ficatului % (nr.)	5,8 (7)
Patologia gastrointestinală % (nr.)	10,8 (13)
Patologia sistemului urinar % (nr.)	15 (18)
AVC anamneză % (nr.)	1,7 (2)

Oxidul nitric – cel mai puternic vasodilatator la nivel endotelial s-a înregistrat la etapa inițială (pe PCI) cu o scădere statistic semnificativă față de lotul de referință în toate cele 3 loturi ($61,72 \mu\text{M/L}$, $58,34 \mu\text{M/L}$, $50,62 \mu\text{M/L}$ vs lotul de referință $78,66 \mu\text{M/L}$). Însă, comparând datele între loturi, putem afirma NO cel mai scăzut fiind în lotul 3 față de lotul 1 ($50,62 \mu\text{M/L}$ vs $61,72 \mu\text{M/L}$) cu $p < 0,05$. Pe parcursul tratamentului cu simvastatină creșterea nivelului NO s-a înregistrat chiar de la etapa post PCI în lotul 1 și 2 la $64,26 \mu\text{M/L}$ și $59,42 \mu\text{M/L}$, iar în lotul 3 fiind aproximativ la același nivel cu etapa pre ($50,62 \mu\text{M/L}$ vs $50,03 \mu\text{M/L}$). La etapa de 3 luni în lotul 1 nivelul NO practic a ajuns nivelul de referință ($78,51 \mu\text{M/L}$ vs $78,66 \mu\text{M/L}$), inclusiv cu creștere nesemnificativă în lotul 3 față de inițial ($64,70 \mu\text{M/L}$ vs $50,62 \mu\text{M/L}$). Putem remarca creșterea semnificativă a oxidului nitric la 6 luni după angioplastia coronariană și, anume: în lotul 1 – $87,26 \mu\text{M/L}$ ($p = 0,01$), lotul 2 – $72,37 \mu\text{M/L}$, lotul 3 – $95,33 \mu\text{M/L}$ – toate trei nivele fiind mai mari decât nivelele inițiale. Astfel, nivelul oxidului nitric a depășit la această etapă în lotul 1 și 2 și nivelul de referință a NO. Toate aceste rezultate ne demonstrează efectele benefice ale statinelor ceea ce ține de acțiunea pleiotropă a lor, în cazul dat, asupra disfuncției endoteliale (tabelul 3).

Mai multe studii clinice sugerează că inhibitorii 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductazei (statinele) au activitate protectoare cardiovasculară suplimentară, care poate funcționa în mod independent de capacitatea lor de a reduce colesterolul seric. La doze terapeutice, statinele promovează proliferarea, migrarea și supraviețuirea celulelor endoteliale, induce mobilizarea și diferențierea în măduva osoasă a derivatelor celulelor progenitoare endoteliale. NO este o

Tabelul 3

Oxidul nitric la diferite etape de evaluare în dinamică

Etapă PCI	Lotul 1 20 mg simvastatină			Lotul 2 40 mg simvastatină			Lotul 3 80 mg simvastatină			P 1,2	P 1,3	P 2,3
	N	M	m	N	M	m	N	M	m			
Pre	43	61,72***	3,25	17	58,34***	4,74	25	50,62***	2,84	>0,05	<0,05	>0,05
Post	49	64,26**	4,61	22	59,41***	3,97	26	50,03***	2,25	>0,05	<0,05	<0,05
1 lună	47	61,32***	3,0	20	58,59***	4,3	22	51,65***	2,60	>0,05	<0,05	>0,05
3 luni	14	78,51	7,0	3	53,24**	11,0	5	64,70	9,13	>0,05	>0,05	>0,05
6 luni	19	87,26	4,30	5	72,37	6,80	2	95,33	10,85	>0,05	>0,05	>0,05
d.post	38	0,79	4,73	16	-0,041	1,62	21	-1,77	3,67	>0,05	>0,05	>0,05
d. 1 l.	37	-3,44	2,77	15	-1,36	4,41	19	-2,68	3,72	>0,05	>0,05	>0,05
d. 3 l.	9	7,30	9,88	2	-30,81	8,34	4	11,85	8,97	<0,05	>0,05	<0,05
d. 6 l.	15	22,09	7,46	5	9,69	11,27	1	63,90	---	>0,05	---	---
P _{dpost}	>0,05			>0,05			>0,05					
P _{d1l}	>0,05			>0,05			>0,05					
P _{d3l}	>0,05			>0,05			>0,05					
P _{d6l}	=0,01			>0,05			---					

Lotul de referință N = 12 M = $78,66 \mu\text{M/L}$ m = 2,72

moleculă importantă de semnalizare care reglează o gamă largă de procese fiziologice și patologice, în diferite țesuturi. Statinele au efecte pleiotropice asupra expresiei și activității de oxid nitric sintetizată de endotelială (eNOS) și duc la îmbunătățirea biodisponibilității NO [13]. Prin urmare, statinele îmbunătățesc vasodilatația, exercită efecte antioxidante și, inhibă agregarea plachetară, adeziunea monocitelor și, proliferarea celulelor musculare netede – toate procesele cu implicare în procesul de ateroscleroză. Statinele pot fi considerate unul dintre cele mai puternice medicamente în prevenirea primară și secundară a bolilor cardiovasculare, iar efectele lor moleculare favorabile sunt confirmate de dovezi clinice prospective extinse. În plus față de proprietățile lor hipolipemice, rolul statinelor, ca agenți de îmbunătățire a NO, este bine stabilit. Având în vedere multitudinea de efecte fiziologice favorabile ale NO, efectul statinelor de cedare a NO, în prevenirea secundară cardiovasculară este foarte mare [14].

La fel, efecte benefice ale NO s-au înregistrat în acest studiu, având o creștere la 6 luni după tratamentul cu simvastatină a nivelului oxidului nitric peste nivelul de referință și nivelul stabilit inițial la etapa până la intervenția de angioplastie coronariană cu implant de stent.

Bibliografie

1. Mills E.J., O'Regan C., Eyawo O., Wu P., Mills F., Berwanger O., and Briel M. Intensive statin therapy compared with moderate dosing for prevention of cardiovascular events: a meta-analysis of > 40,000 patients. *Eur Heart J* 32: 1409–1415, 2011.
2. Winchester D.E., Wen X., Xie L., and Bavry A.A. Evidence of pre-procedural statin therapy a meta-analysis of randomized trials. *J Am Coll Cardiol* 56: 1099–1109, 2010.
3. Ni Chroinin D., Asplund K., Asberg S., Callaly E., Cuadrado-Godia E., Diez-Tejedor E., Di Napoli M., Engelter S.T., Furie K.L., Giannopoulos S., Gotto A.M. Jr., Hannon N., Jonsson F., Kapral M.K., Marti-Fabregas J., Martinez-Sanchez P., Milionis H.J., Montaner J., Muscari A., Pikijsa S., Probstfield J., Rost N.S., Thrift A.G., Vemmos K., and Kelly P.J. Statin therapy and outcome after ischemic stroke: systematic review and metaanalysis of observational studies and randomized trials. *Stroke* 44: 448–456, 2013.
4. Mihaylova B., Emberson J., Blackwell L., Keech A., Simes J., Barnes E.H., Voysey M., Gray A., Collins R., and Baigent C. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet* 380: 581–590, 2012.
5. Antoniadou C., Van-Assche T., Shirodaria C., Dieck J., Antonopoulos A.S., Lee J., Cunningham C., Tousoulis D., Stefanadis C., Casadei B., Taggart D., Channon K.M., and Leeson P. Preoperative sCD40L levels predict risk of atrial fibrillation after off-pump coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 120: S170–S176, 2009.
6. Deanfield J.E., Halcox J.P., and Rabelink T.J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 115: 1285–1295, 2007.
7. Frei B., Stocker R., and Ames B.N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9748–9752, 1988.
8. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* 358: 2148–2159, 2008.
9. Myung S.K., Ju W., Cho B., Oh S.W., Park S.M., Koo B.K., and Park B.J. Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 346: f10, 2013.
10. Istvan E.S. and Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292: 1160–1164, 2001.
11. Margaritis M., Channon K.M. and Antoniadou C. Statins and vein graft failure in coronary bypass surgery. *Curr Opin Pharmacol* 12: 172–180, 2012.
12. Schächinger V., Britten M.B., Zeiher A.M. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 1899–1906.
13. Ma F.X., Han Z.C. Statins, nitric oxide and neovascularization. *Cardiovasc Drug Rev.* 2005 Winter;23(4):281-92.
14. Stephan H. Schirmer et al. Nitric oxide-donating statins: a new concept to boost the lipid-independent effects. *Cardiovasc Res* (2012)doi: 10.1093/cvr/cvs148First published online: April 12, 2012.